

2105

ETUDE DE LA CONSTITUTION DE LA CASEINE DE VACHE
PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES DE
DIETHYLAMINOETHYL-CELLULOSE EN MILIEU UREE

SUMMARY

A study of cow casein composition by DEAE-cellulose column chromatography in urea
The fractionation of whole cow casein by DEAE-cellulose chromatography in urea, part of which was published in a preliminary note, has been continued.

1. The composition of whole casein, determined by this method is the following: Minor fractions having an electrical charge lower than β -casein at pH 7, 13%; β -casein, 30%; κ -casein, 11%; α_s -casein (minor fraction, 6%; $\alpha_{s1,2}$, 38%).
2. The quantitatively more important Fractions F_{10} and F_7 (corresponding approximatively to α_s - and β -caseins) have been more specially studied. Fraction F_7 contains only a minor impurity. It has been possible to eliminate this impurity by a method which will be published later, but Fraction F_{10} still contains some minor impurities.

INTRODUCTION

On sait, depuis longtemps déjà que les différents constituants de la caséine sont, en totalité ou en partie, sous forme de complexes très stables.

La stabilité de ces complexes ne semble pas due à des interactions ioniques, car ils subsistent à des pH où la charge nette de chacun des constituants est négative¹. On peut donc penser que des liaisons secondaires (liaisons hydrogènes ou forces de VAN DER WAALS) sont en cause. A la suite des travaux de WAUGH *et al.*² il nous a paru intéressant d'étudier les possibilités de fractionnement de la caséine totale, en milieu urée, par chromatographie sur colonnes de DEAE-cellulose.

L'emploi de l'urée dans notre travail a pour but de dissocier les deux types de liaisons mentionnées plus haut: en effet la molécule d'urée est fortement polaire (son moment dipolaire est de 4.56 unités Debye, alors que celui de l'eau est de 1.84) et par suite susceptible de contracter de nouvelles liaisons hydrogènes avec les groupements qui en forment dans la caséine. Par ailleurs, la constante diélectrique des solutions d'urée étant supérieure à celle de l'eau (90.6 pour l'urée 5 M, 78.5 pour l'eau), les interactions entre ions, dipôles permanents et dipôles induits sont réduites.

L'efficacité des séparations a été contrôlée par différentes méthodes électro-

tampon (II) 0.02 M-urée 3.3 M, selon WAUGH *et al.*². L'imidazole à pH 7 a surtout été employé.

Les tampons sont préparés de la manière suivante: on fait d'abord des solutions d'urée 4.5 M et 3.3 M. Celles-ci sont agitées 30 min en présence de charbon activé (environ 1 g/l), filtrées sur papier, et passées sur une colonne de DEAE-cellulose de 3 cm de diamètre, 10 cm de longueur. La première opération a pour but d'éliminer des impuretés de l'urée qui absorbent à 280 m μ , la seconde, d'éliminer d'autres impuretés qui se fixeraient éventuellement sur la colonne par la suite (et aussi des traces de charbon qui restent dans la solution).

Les solutions d'urée ainsi préparées sont ajustées respectivement à 0.01 M et 0.02 M en imidazole, et le pH amené à 7 avec HCl concentré.

Elution: les éluions ont eu lieu à pH constant et à force ionique croissante (augmentation de la concentration du tampon II en NaCl), soit par paliers selon la technique de WAUGH *et al.*², soit par un gradient exponentiel continu (NaCl 0 à 0.6 M). La chambre de mélange à volume constant contient 200 ml ou 2000 ml de tampon II-NaCl 0.6 M respectivement pour les colonnes analytiques et préparatives.

Une fraction plus ou moins importante suivant les cas ne peut être éluee, même par une concentration très élevée en NaCl. Elle est détachée de la colonne par de la soude 0.25 N.

Electrophorèses en gel d'amidon

Nous avons utilisé la technique de WAKE ET BALDWIN³ dans un appareil horizontal. Les électrophorèses dans l'urée 5.0 M (pH 3.8) ont été réalisées en utilisant les conditions de GROVES *et al.*¹¹.

Electrophorèses en gélose et immunoelectrophorèses

Les techniques utilisées sont décrites en détail par GARNIER *et al.*¹².

Electrophorèses en veine liquide en urée 5 M

Elles ont été effectuées par le Centre d'électrophorèse du C.N.R.S., à 4°, en tampon phosphate-urée 5 M (pH 6.5, $I = 0.05$ ou 0.1). La présence de l'urée conduit à des anomalies dans les courbes. Les branches descendantes sont souvent ininterprétables. Ceci peut être dû au fait que l'urée interagit fortement avec les protéines. Par ailleurs on observe parfois des gradients de convection qu'on peut attribuer au fait que les solutions d'urée ne présentent pas un maximum de densité à 4°.

On a utilisé des concentrations en protéines de 0.5 à 3 %.

Dosages de phosphore

Les dosages de phosphore ont été effectués selon BAMANN *et al.*¹³.

Dosages de l'acide N-acétyl neuraminique

Les dosages de l'acide N-acétyl neuraminique ont été effectués par la méthode de WARREN¹⁴, après hydrolyse (H₂SO₄ 0.1 N pendant 1 h à 85°). L'étalon utilisé pour les dosages est l'acide N-acétyl neuraminique préparé à partir de la caséine totale¹⁵.

Extraits secs

Tous les dosages ont été faits sur des produits lyophilisés à pH 7, desséchés sous vide 24 h sur P₂O₅.

FRACTIONNEMENT DE LA CASEINE SUR DEAE-CELLULOSE

phorétiques, en particulier par électrophorèse sur gel d'amidon en urée 7 M, selon WAKE ET BALDWIN³ et l'immunoélectrophorèse selon GRABAR ET WILLIAMS⁴, qui présente l'avantage de pouvoir être utilisée en l'absence d'urée.

Les débuts de ce travail ont fait l'objet d'une note préliminaire⁵.

MATERIEL ET METHODE

Caséines et fractions analysées

La caséine totale est préparée à partir de lait de mélange par trois précipitations à pH 4.6. Après la dernière précipitation la caséine lavée est solubilisée à pH 7 puis lyophilisée.

Des essais comparatifs ont été faits avec la caséine ainsi préparée et la caséine ter cycle, préparée selon VON HIPPEL ET WAUGH⁶. Les différences observées paraissant négligeables, la plupart des essais ont été effectués avec la caséine isoélectrique.

Diverses fractions de caséine de vache ont également été préparées:

Fraction sensible au calcium: elle a été obtenue par précipitation au chlorure de calcium⁷, redissolution dans une solution de 0.1 M citrate de potassium (pH 7) et dialyse. L'opération est répétée et la solution finale est lyophilisée.

Caséines α et β , selon HIPP *et al.*⁸. Caséine α_s , selon WAUGH *et al.*⁹. Caséine κ , selon MCKENZIE ET WAKE⁷.

Echangeurs d'ions et matériel de chromatographie

Nous avons utilisé pour les chromatographies de la DEAE-cellulose Serva (capacité 0.6 méquiv./g). Il est à noter que certains lots n'ont pas donné des résultats satisfaisants. Des essais ont été faits également sur la GE-cellulose Serva.

Electrophorèses en veine liquide

Appareil Fokal B-Strübin. Système optique Schlieren.

Chromatographie sur colonnes

Colonnes analytiques de 1 cm de diamètre, 10 cm de longueur, ou préparatives de 3 cm de diamètre, 25 cm de longueur. Pour les premières, les vitesses d'écoulement étaient de 13 ml/h et les fractions, de 1.5 ou 2.5 ml. Pour les secondes, vitesses d'écoulement de 85 ml/h, et fractions de 10 ml.

Les chromatographies ont eu lieu à température ambiante.

Préparation des colonnes: La cellulose est lavée à la soude 1 N, à l'eau distillée, et avec une solution HCl 0.1 N, NaCl 25 %, ou un tampon pipérazine-HCl 0.1 M-NaCl 20 % (pH 4.4) selon SEMENZA¹⁰. Elle est ensuite lavée à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Ces opérations sont répétées dans le même ordre sur colonne après chaque chromatographie.

Après décantation dans le tampon de départ et dégazage sous vide, la colonne est enfin remplie et lavée pendant une nuit avec le tampon de départ.

Fixation des protéines sur la colonne: On a utilisé en général une charge de 50 mg pour les colonnes analytiques, 1-2 g pour les colonnes préparatives, de protéine lyophilisée dissoute dans le tampon de départ (solution à 8-10 %).

Préparation des tampons: La plupart des chromatographies ont été réalisées en fixant la protéine dans un tampon (I) 0.01 M-urée 4.5 M. et en l'éluant dans un

B. RIBADEAU-DUMAS, J. L. MAUBOIS, G. MOCQUOT, J. GARNIER

Dans tous les cas, les sommes des degrés d'absorption des fractions correspondant à chaque pic ont été transformées en poids de substance en tenant compte des coefficients d'extinction suivants, déterminés, sur les fractions rechromatographiées, dans le tampon correspondant (tampon I, tampon II, NaOH 0.25 N).

TABLEAU I

	Coefficient d'extinction à 280 m μ (solution à 1 mg/ml, cuvette d'épaisseur 1 cm)
F ₁	0.652
F ₂ -F ₆	0.632
F ₇	0.572
F ₈ -F ₉	0.920
F ₁₀ -F ₁₁	0.879
F ₁₂	0.962
Caséine totale	0.752

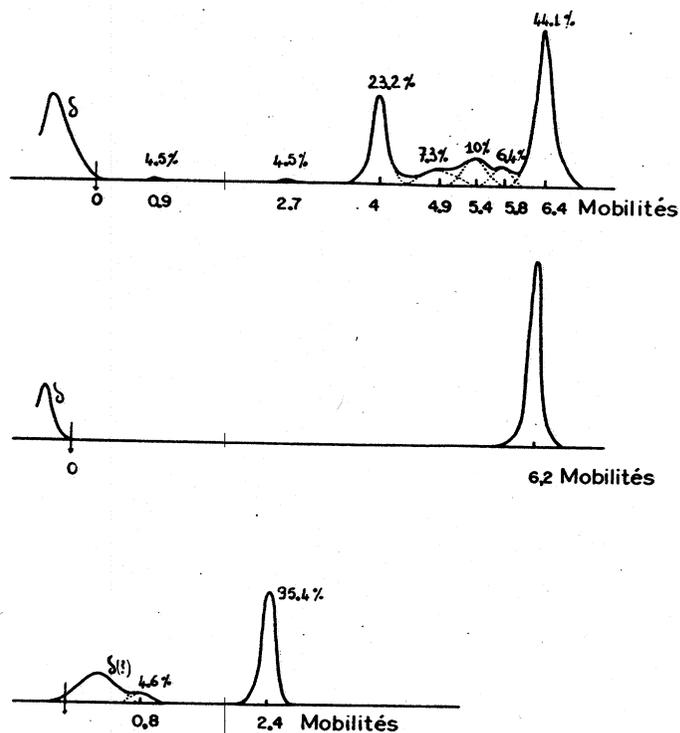


Fig. 2. Electrophorèse en veine liquide de la caséine totale et des Fractions 10 et 7 non rechromatographiées. Tampon phosphate-urée 5 M_i (pH 6.6, $I = 0.05$) à 4°. Branches montantes. Les mobilités sont exprimées en $\text{cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{sec}^{-1} \times 10^3$. Les chiffres placés au-dessus de chaque pic indiquent le pourcentage de sa surface par rapport à la surface totale du diagramme. 1, Caséine totale (2%) à 7.3 V/cm pendant 12 000 sec; 2, Fraction 10 (1%) à 7.3 V/cm pendant 11 000 sec; 3, Fraction 7 (1%) à 7.9 V/cm pendant 16 500 sec. Après diffusion d'une nuit.

B. RIBADEAU-DUMAS, J. L. MAUBOIS, G. MOCQUOT, J. GARNIER

Dans tous les cas, les sommes des degrés d'absorption des fractions correspondant à chaque pic ont été transformées en poids de substance en tenant compte des coefficients d'extinction suivants, déterminés, sur les fractions rechromatographiées, dans le tampon correspondant (tampon I, tampon II, NaOH 0.25 N).

TABLEAU I

	Coefficient d'extinction à 280 m μ (solution à 1 mg/ml, cuve d'épaisseur 1 cm)
F ₁	0.652
F ₂ -F ₆	0.632
F ₇	0.572
F ₈ -F ₉	0.920
F ₁₀ -F ₁₁	0.879
F ₁₂	0.962
Caséine totale	0.752

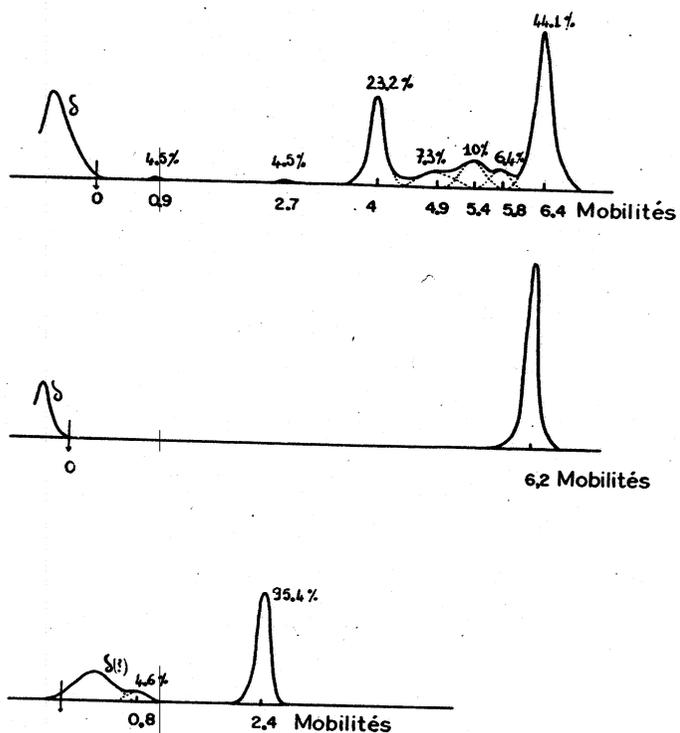


Fig. 2. Electrophorèse en veine liquide de la caséine totale et des Fractions 10 et 7 non rechromatographiées. Tampon phosphate-urée 5 M₁ (pH 6.6, $I = 0.05$) à 4°. Branches montantes. Les mobilités sont exprimées en $\text{cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{sec}^{-1} \times 10^5$. Les chiffres placés au-dessus de chaque pic indiquent le pourcentage de sa surface par rapport à la surface totale du diagramme. 1, Caséine totale (2%) à 7.3 V/cm pendant 12 000 sec; 2, Fraction 10 (1%) à 7.3 V/cm pendant 11 000 sec; 3, Fraction 7 (1%) à 7.9 V/cm pendant 16 500 sec. Après diffusion d'une nuit.

B. RIBADEAU-DUMAS, J. L. MAUBOIS, G. MOCQUOT, J. GARNIER

indique la présence de F_9 . Par ailleurs, les Fractions F_2 à F_6 sont moins nettes qu'avec les colonnes de 3 cm de diamètre.

4. Les différentes fractions ont été étudiées, sans rechromatographie, sauf pour F_7 et F_{10} , dont les diagrammes de rechromatographie sont donnés dans la Fig. 3.

La Fraction F_1 est soluble à pH 4.7 et aux pH inférieurs. Elle est insoluble à pH 7 à 22°, mais une partie de cette fraction est soluble à pH 7 à 2°. Elle est stable vis-à-vis des ions calcium.

Par chromatographie de cette fraction sur GE-cellulose en tampon Tris 0.02 M (pH 9), dans les conditions habituelles le gradient sépare 2 pics, l'un représentant 50.4 % et l'autre 12.3 %. Le reste, soit 5.7 %, est élué par la soude 0.25 N. Une fraction représentant 31.2 % en degré d'absorption n'est pas retenue.

Par électrophorèse en gel d'amidon, la Fraction F_1 montre 4 constituants principaux, et 6-7 constituants en faibles proportions (Fig. 4).

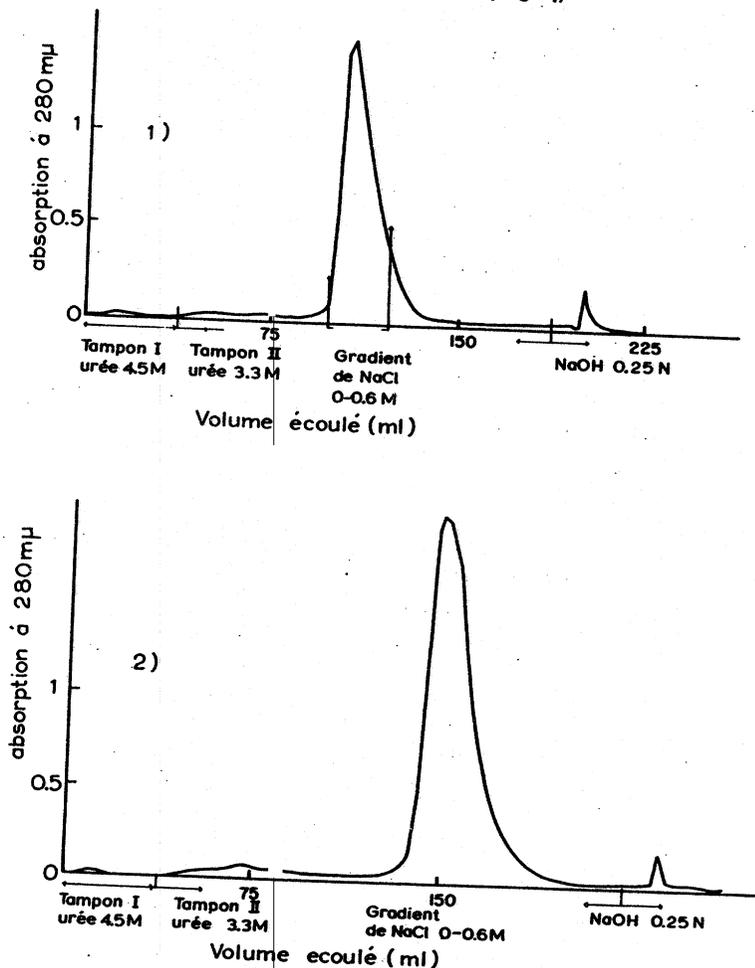


Fig. 3. Diagrammes de rechromatographie des Fractions 7 et 10. Colonnes de DEAE-cellulose de 1 cm de diamètre, 10 cm de longueur. Température ordinaire. Fractions de 1.5 ml. Vitesse d'écoulement: 15 ml/h. 1, 50 mg de Fraction 7; 2, 50 mg de Fraction 10.

FRACTIONNEMENT DE LA CASEINE SUR DEAE-CELLULOSE

2. A la sortie de la colonne, le sommet de chaque "pic" est élué à une concentration en NaCl d'autant plus faible que la charge est plus importante.

La séparation est d'autant meilleure que la charge est plus faible. Pratiquement avec 1 ou 2 g de caséine, sur une colonne préparative, la séparation est suffisamment bonne et la charge assez importante pour obtenir des fractions qui peuvent être facilement purifiées par rechromatographie.

Par ailleurs nous avons observé, dans les mêmes conditions, une séparation toujours plus efficace sur les colonnes de gros diamètre.

3. En tenant compte des coefficients d'extinction mentionnés ci-dessus, le pourcentage des fractions, par rapport à la quantité totale de protéines recueillie, est présenté dans le Tableau II, d'une part pour la caséine totale et d'autre part pour la fraction sensible au calcium.

Le rendement des colonnes, calculé d'après les degrés d'absorption recueillies et les coefficients d'extinction de chaque fraction est de 95 à 102 % de la quantité de protéines mise sur la colonne.

TABLEAU II

	Caséine totale (%)	Fraction sensible au calcium (%)
F ₁	5.1	8.8
F ₂ -F ₆	8.0	6.7
F ₇	30.5	33.7
F ₈ -F ₉	10.3	} 49.7
F ₁₀ -F ₁₁	44.9	
F ₁₂	1.2	1.1
	100	100

Des résultats précédents, on peut déduire par un calcul simple les pourcentages des Fractions β , κ et α_s dans la caséine totale, si l'on admet que seules les fractions qui sont éluées après la caséine β contiennent la caséine κ (comme on le voit dans la Fig. 1, la Fraction 7 est peu contaminée par la caséine κ). Il avait été montré dans la note préliminaire⁵ que les Fractions F₈-F₁₀-F₁₁ correspondaient à la caséine α_s , et que la fraction correspondant à κ (F₈) se poursuivait par une "trainée", pratiquement jusqu'à la fin de l'éluion de F₁₁.

En admettant également que la fraction sensible au calcium est entièrement et uniquement dépourvue de caséine κ (comme le montrent les électrophorèses en gel d'amidon et sa teneur en acide N-acétyl neuraminique de 0.06 %) la composition de la caséine totale est alors: F₁, 5.1 %; F₂-F₆, 8.0 %; β , 30.5 %; κ , 10.9 %; α_s , 44.3 %; F₁₂, 1.2 %.

Compte tenu de la manière dont ces résultats ont été obtenus, on doit les considérer comme assez approximatifs*.

Les colonnes analytiques nous ont donné des résultats un peu différents à cause de leur moindre efficacité:

On ne distingue pas, dans le cas de ces colonnes, la Fraction F₈. Seule une épaule

* Les chiffres correspondant aux pourcentages des caséines κ et α_s sont très voisins de ceux correspondant à F₈-F₉ et F₁₀-F₁₁. Mais cette coïncidence est purement fortuite.

Par immunoelectrophorese, on observe une ligne principale surmontee d'une ligne de mobilite un peu plus elevee, correspondant vraisemblablement a un compose en faible quantite (Fig. 6a).

La Fraction F_8 correspond a la caséine κ , comme il a été montré dans la note préliminaire⁵. Sa purification par rechromatographie en présence d'urée dans les

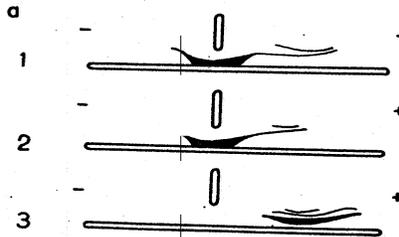


Fig. 6. Schémas d'immunoélectrophorèses et d'électrophorèses en amidon (urée 7 M (pH 8.6)) de différentes fractions obtenues par chromatographie. a, Immunoélectrophorèses. Concentration en protéine de la solution mise dans le réservoir, 0.5%. b, Electrophorèses en amidon. Concentration en protéine de la solution mise dans le réservoir, 0.8%. a1, caséine β obtenue de la caséine totale par rechromatographie en milieu urée de F_7 ; a2, b1, caséine β obtenue de la fraction sensible au calcium par rechromatographie en milieu urée de F_7 . a3, b2, Fraction 10 obtenue de la fraction sensible au calcium par rechromatographie en milieu urée.

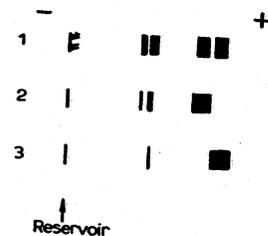


Fig. 7. Schémas d'électrophorèses en amidon (urée 5 M (pH 3.8)) de différentes fractions obtenues par chromatographie. Concentration en protéine de la solution mise dans le réservoir, 0.8%. 1, caséine totale; 2, caséine β obtenue de la fraction sensible au calcium par rechromatographie en milieu urée de F_7 . 3, Fraction 10 obtenue de la caséine totale par rechromatographie.

conditions que nous avons utilisées ne paraît pas possible, comme nous le verrons plus loin.

A la Fraction F_8 correspondent, par électrophorèse en gel d'amidon à pH 8.6 (Fig. 4), 2 bandes qui existent dans la caséine α préparée selon HIPP *et al.*⁸ et la caséine α_s préparée selon WAUGH *et al.*⁹ et qui sont vraisemblablement celles dénommées par WAKE *et al.*³ 1.00 et 1.04.

La Fraction F_{10} , correspondant à la plus grande partie de la caséine α_s , rechromatographiée en présence d'urée, montre par électrophorèse en gel d'amidon à pH 8.6 (Fig. 6), une bande principale, renfermant probablement les composants α_{s1} et α_{s2} de WAUGH *et al.*¹⁶, que nous n'avons pu toujours discerner et une bande secondaire très faible migrant légèrement en avant de β , et correspondant à la Fraction 0.86 de WAKE ET BALDWIN³. Deux lignes très estompées sont visibles en outre dans certaines préparations.

A pH 3.8, on observe également 2 bandes (Fig. 7).

FRACTIONNEMENT DE LA CASEINE SUR DEAE-CELLULOSE

Cette fraction, étant insoluble au pH de l'immunoélectrophorèse, ne donne pas d'arcs de précipitation avec le sérum anti-caséine.

Les Fractions F₂ à F₆, par électrophorèse en gel d'amidon à pH 8.6, donnent plusieurs bandes et traînées entre le réservoir et la bande correspondant à β (Fig. 4).

L'immunoélectrophorèse met en évidence plusieurs constituants dans ces fractions, les lignes de précipitation de F₃ se distinguant nettement des autres par leur mobilité et l'importance de celles que l'on observe en arrière du réservoir (Fig. 5).

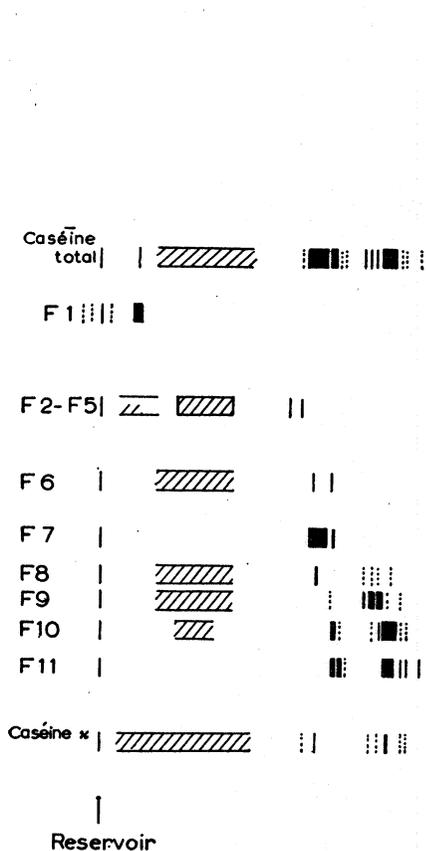


Fig. 4. Schémas d'électrophorèses en amidon (urée 7 M (pH 8.6)) des différentes fractions de caséine totale (non rechromatographiées), isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose. Concentration de la solution protéique mise dans le réservoir, 0.8%.

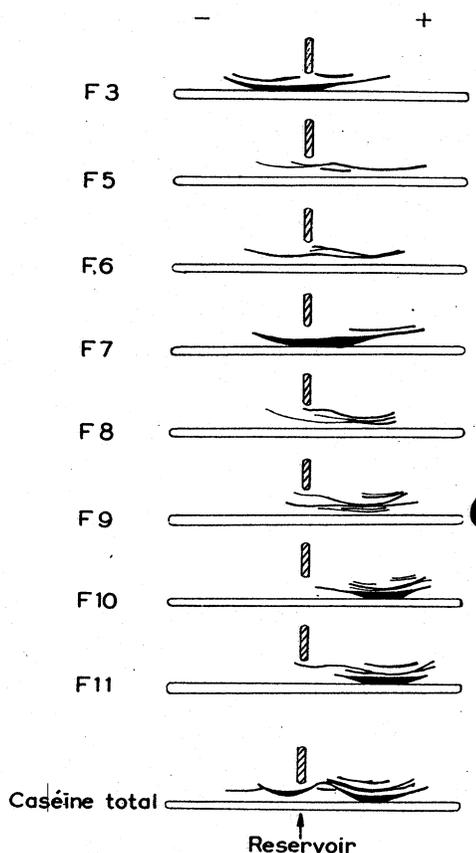


Fig. 5. Schémas d'immunoélectrophorèses des différentes fractions de caséine totale (non rechromatographiées), isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose. Concentration en protéine de la solution mise dans le réservoir 0.5%.

La Fraction F₇, correspondant à la caséine β , rechromatographiée en milieu urée, montre par électrophorèse en gel d'amidon à pH 8.6 une bande, parfois précédée et suivie d'une ligne fine (Fig. 6b). Par cette même méthode mais à pH 3.8 selon GROVES *et al.*¹¹, on observe 2 à 3 bandes, dont l'une (la plus mobile) prédomine nettement (Fig. 7).

NaCl 0 à 2 M, chaque tampon différant du précédent de 0.02 M). Le diagramme de chromatographie est donné dans la Fig. 8.

Il est à noter que nous avons obtenu des résultats différents (la sortie des pics était décalée) avec des lots différents de DEAE-cellulose. Les résultats que nous donnons correspondent à un lot déterminé et ne sont pas toujours reproductibles.

De 0 à 0.10 M en NaCl, on observe à chaque tampon l'élution de matériel en très faible quantité.

Lorsqu'on passe directement après fixation de la protéine le tampon 0.12 M, on obtient 2 pics. Le premier, qui est le moins important, correspond aux fractions précédentes. Il donne, par électrophorèse en gel d'amidon, plusieurs bandes et traînées entre le réservoir et la Fraction β .

Le second, qui correspond à la Fraction F_7 , donne parfois par la même technique, une ligne fine supplémentaire située juste devant la bande principale.

Le tampon 0.14 M élue une très petite quantité de protéines.

Dans le tampon 0.16 M, on observe 2 pics mal séparés. Le second "traîne" beaucoup.

La caséine α_s sort essentiellement dans le tampon 0.18 M.

De 0.18 à 0.24 M, sortie de protéines en faible quantité. Pratiquement rien n'est élué entre 0.24 M et 2 M.

Les fractions obtenues dans les tampons 0.12 et 0.18 M correspondant respectivement à F_7 et F_{10} , ont les mêmes propriétés après rechromatographie que les fractions correspondantes obtenues avec une élution par gradient de molarité en NaCl.

DISCUSSION

L'urée (ou peut-être une autre substance qui posséderait des propriétés similaires) est indispensable pour obtenir sur DEAE-cellulose à pH 7 un fractionnement effectif de la caséine. Par chromatographie sans urée dans les conditions que nous avons utilisées habituellement (fixation de la protéine dans un tampon imidazole 0.01 M-HCl (pH 7) et élution par gradient de molarité en NaCl dans un tampon imidazole 0.02 M-HCl (pH 7) la caséine ne se sépare qu'en 2 fractions presque confondues; de plus une quantité importante de matériel ne peut être élue que par la soude.

On connaît bien le pouvoir dénaturant de l'urée. Cependant, dans les conditions de concentrations et de température où nous nous sommes placés, on peut penser que l'action de l'urée ne produit pas une dénaturation irréversible.

Il est probable que l'urée dissocie bien les liaisons hydrogènes, comme cela a été montré pour la fibrine. Il semble que les difficultés rencontrées dans le fractionnement de la caséine viennent d'une part de la présence possible de liaisons de VAN DER WAALS intermoléculaires, d'autre part des charges et des poids moléculaires très voisins de ses différents constituants; enfin peut-être d'une dissociation incomplète des complexes par l'urée aux concentrations où celle-ci a été utilisée pour les chromatographies.

On peut envisager actuellement un schéma de constitution de la caséine totale:

(1) Fractions mineures de points isoélectriques voisins de 7, se distinguant nettement en cela des autres constituants. Ce sont les fractions qui ne se fixent pas sur DEAE-cellulose à pH 7. Elles représentent 5 % de la caséine totale et correspondent aux fractions solubles à pH 4.0 de GROVES¹⁸.

REMERCIEMENTS

Une partie de ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (FG-Fr-103-61). Nous remercions Melle VEAUX, Mme G. BRIGNON et Melle B. NITSCHKE de leur collaboration technique; le Dr. T. L. McMEEKIN qui nous a fourni une préparation de caséine β , et M. et Mme de MENDE pour les travaux qu'ils ont bien voulu effectuer pour nous, et les conseils éclairés qu'ils nous ont prodigués.

RESUME

Le travail de fractionnement de la caséine totale de vache par chromatographie sur DEAE-cellulose en milieu urée, dont les débuts avaient fait l'objet d'une note préliminaire, a été poursuivi.

1. La composition de la caséine totale, déterminée par cette méthode, est la suivante: Fractions mineures de charges électriques inférieures à la caséine β à pH 7, 13 %; caséine β , 30 %; caséine κ , 11 %; caséine α_s : fractions secondaires, 6 %; $\alpha_{s1,2}$, 38 %.

2. Les fractions quantitativement les plus importantes F_{10} et F_7 (qui correspondent approximativement aux caséines α_s et β) ont été étudiées plus spécialement.

La Fraction F_7 ne renferme qu'une impureté mineure, dont l'élimination a pu être réalisée par une technique qui sera publiée ultérieurement, mais la Fraction F_{10} contient encore plusieurs impuretés mineures.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. F. WAUGH, *Discussions Faraday Soc.*, 25 (1958) 186.
- ² D. F. WAUGH, J. M. GILLESPIE, J. GARNIER ET G. BROWN, résultats non publiés.
- ³ R. G. WAKE ET R. L. BALDWIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 225.
- ⁴ P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS, JR., *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- ⁵ B. RIBADEAU DUMAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 54 (1961) 400.
- ⁶ P. H. VON HIPPEL ET D. F. WAUGH, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 4311.
- ⁷ H. A. MCKENZIE ET R. G. WAKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 47 (1961) 240.
- ⁸ N. J. HIPPEL, M. L. GROVES, J. H. CUSTER ET T. L. McMEEKIN, *J. Dairy Sci.*, 35 (1952) 272.
- ⁹ D. F. WAUGH, M. LUDWIG, J. M. GILLESPIE, J. GARNIER, E. S. KLEINER ET R. W. NOBLE *Federation Proc.*, 19 (1960) 337.
- ¹⁰ G. SEMENZA, *Chimia*, 14 (1960) 325.
- ¹¹ M. L. GROVES, T. L. McMEEKIN, N. J. HIPPEL ET W. G. GORDON, *Biochim. Biophys. Acta*, 57 (1962) 197.
- ¹² J. GARNIER, B. RIBADEAU DUMAS ET J. GAUTREAU, *16ème Congr. Intern. Laiterie*, Vol. B, Sect. IV, 1961, p. 655.
- ¹³ E. BAMANN, E. NOVOTNY ET L. ROHR, *Chem. Ber.*, 81 (1948) 438.
- ¹⁴ L. WARREN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1971.
- ¹⁵ B. RIBADEAU DUMAS ET C. ALAIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 43 (1961) 377.
- ¹⁶ D. F. WAUGH, M. L. LUDWIG, J. M. GILLESPIE, B. MELTON, M. FOLEY ET R. S. KLEINER, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 4929.
- ¹⁷ D. G. SCHMIDT ET T. A. J. PAYENS, en cours de publication.
- ¹⁸ M. L. GROVES, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 3345.
- ¹⁹ M. P. THOMPSON, C. A. KIDDY, L. PEPPER ET C. A. ZITTLE, *Nature*, 195 (1962) 1001.

(2) Fractions mineures éluées sur DEAE-cellulose en milieu urée, à pH 7, avant la caséine β . Elles renferment la caséine γ et représentent 8 % de la caséine totale.

(3) Caséine β , 30 % de la caséine totale.

(4) Caséine κ , 11 % de la caséine totale.

(5) Caséine α_s , elle renferme toute une série de constituants.

Les caséines α_s , B et C de THOMPSON *et al.*¹⁹, à caractère génétique, paraissent correspondre, d'après les diagrammes d'électrophorèse en gel d'amidon donnés par ces auteurs, aux caséines α_{s1} et α_{s2} de WAUGH *et al.*¹⁶. Nous n'avons trouvé, pour notre part, dans les laits individuels de 4 vaches de race Française Frisonne Pie Noire et dans les laits de mélange, que $\alpha_s B$ et $\alpha_s C$.

Les constituants 1.00 et 1.04 peuvent être aisément séparés du complexe α_s par chromatographie sur DEAE-cellulose dans les conditions que nous avons employées.

Dans ces mêmes conditions, le constituant 0.86 est séparé difficilement en totalité par 2 chromatographies. Il est possible que plusieurs rechromatographies l'éliminent.

Les constituants mineurs 0.92, 0.95, 1.24, 1.26 et 1.31 sont éliminés en général de la caséine α_s par rechromatographie sur DEAE-cellulose.

Le chiffre de 44 % de caséine α_s que nous obtenons est à comparer à celui de WAUGH *et al.*¹⁶: selon ces auteurs 45 % en degré d'absorption de la caséine totale représente $\alpha_{s1, 2}$. En tenant compte des coefficients d'extinction mentionnés au début du présent travail, ceci représente, en poids, 38 % de la caséine totale. C'est dire que les fractions secondaires de la caséine α_s représentent 6 % de la caséine totale, ou 14 % de la caséine α_s .

Comme on le voit dans la Fig. 2, l'électrophorèse en veine liquide (pH 6.5, 5 M urée) sépare de la caséine totale 7 fractions. Deux fractions lentes correspondent chacune à 4.5 % de la caséine totale.

La Fraction β représente 23 % et la fraction α_s représente 44 % de la caséine totale.

On observe, entre β et α_s , 3 fractions, dont l'une de mobilité 5.4 semble correspondre à la caséine κ (comme nous l'avons vérifié en ajoutant 10 % de caséine κ à la caséine totale). Cette fraction représente 10 % de la caséine totale.

Ces chiffres correspondent bien dans l'ensemble à ceux que nous obtenons par chromatographie. Cependant le pourcentage obtenu par électrophorèse en veine liquide pour la caséine β est notablement inférieur à celui obtenu par chromatographie.

La fraction de mobilité 5.8, qui représente 6.4 % de la caséine totale, semble pouvoir être identifiée aux fractions 1.00 et 1.04 de WAKE ET BALDWIN, que l'on trouve dans la caséine α_s .

Les Fractions F_7 et F_{10} obtenues par 2 chromatographies sur DEAE-cellulose en milieu urée sont plus homogènes que les fractions correspondantes (β et α_s) préparées selon HIPPEL *et al.*⁸, et WAUGH *et al.*⁹. Elles renferment cependant plusieurs constituants décelables par immunoelectrophorèse.

La Fraction F_7 ne renferme cependant en général qu'une impureté en faible quantité. Nous avons pu, par une technique qui sera publiée ultérieurement, l'éliminer et obtenir ainsi une caséine β immunoelectrophorétiquement homogène.

La Fraction 10 que nous avons obtenue contient au moins 3 constituants antigéniques différents.

La chromatographie de la caséine totale avec élution par paliers de concentration en NaCl conduit à l'isolement de Fractions F_7 et F_{10} analogues. Mais la durée de l'opération due à une "trainée" considérable des pics en rend l'application malaisée